14-04

Nucleic Acid Purification Kit

MagExtractor™ -Genome-

(Code No. NPK-101,102)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3265K

ー 目次 ー

ご注意）

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

MagExtractor™ -Genome-は、カオトロピック剤の存在下でDNAがシリカに吸着する性質[1), 2)]を利用したGenomic DNA抽出用試薬です。本キットを自動核酸抽出装置MFX-2000/2100で使用することにより、全血や培養細胞などの生体サンプルから高純度なGenomic DNAを簡便に抽出できます。また、本キットはマニュアル抽出用キットとしてもお使いいただけます。

特徴

- エタノール沈殿操作、遠心分離操作を必要としないため、短時間で抽出が可能です。
- フェノールやクロロホルムなどの危険な溶媒を使用しません。
- 全血から直接、DNA抽出が行えますので、煩雑な白血球やリンパ球の分離操作は不要です。
- 抽出されたDNAは、滅菌水中に回収されますので、直ちにPCR法などの解析手段に利用できます。

[2] ご使用になる前に

MagExtractor™ -Genome-は主に以下のサンプルからの抽出が可能です。

対応サンプル	収量	純度(A260/280比)	用途
血液	2μg/100μl全血	1.8±0.1	PCR
培養組織	3μg/5×10^{5}cell(HeLa)		
組織	5μg/5mg組織(ブタ精巣)		
マウステール	3μg/2mmテール		

- 組織とマウステールの場合には、前処理(ホモジナイズと溶解)が必要となります。詳しくは4～5ページをご覧ください。
- 収量はサンプルの種類や状態により変動します。記載されている数値は目安としてお考えください。
- この他、適切な前処理を行うことによって、パラフィン包埋固定組織切片、酵母、乳酸菌等からの抽出も可能なことが確認されています(情報の詳細は、弊社テクニカルラインへお問い合わせください)。
- 本キットは、室温(20～30℃)でご使用ください。低温または高温でのご使用の場合、本キットの性能が発揮されないことがあります。

(1)

[3] キットに含まれるもの

MagExtractor™ -Genome- には、100 回用(Code No.:NPK-101)と500回用(Code No.:NPK-102)のものがあります。

NPK-101(100回用)

100ml	溶解・吸着液(タンパク質変性剤含有)	4℃保存
200ml	洗浄液(タンパク質変性剤含有)	4℃保存
5ml	磁性ビーズ	4℃保存

NPK-102(500回用)

500ml	溶解・吸着液(タンパク質変性剤含有)	4℃保存
500ml ×2ml	洗浄液(タンパク質変性剤含有)	4℃保存
25ml	磁性ビーズ	4℃保存

- 全て4℃にて保存し、使用前にはあらかじめ室温にもどしておいてください。短期間(1ヶ月以内)の場合には、室温(25℃以下)での保存も可能です。
- 溶解・吸着液と洗浄液には、高濃度のタンパク質変性剤が含まれていますので、取扱いには十分注意し、手袋を着用するなどの防護措置を講じてください。万一、試薬が手などの皮膚に付着した場合には、十分に水洗を行い、また、目に入った場合には、水洗を行った後に医師の手当を受けてください。
  また、10%を超える高濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液などの酸化作用のある物質と混合した場合、有毒ガスが発生する可能性がありますので、混合しないでください。
- 弊社の自動核酸抽出装置MFX-2000/2100でご使用になる場合は、指定のチューブに必要量を分注し、決められた場所にセットしてください。詳しくはMFX-2000/2100の取扱い説明書をご覧ください。

[4] プロトコール

1. キットの他に必要なもの

(1) 試薬

- 滅菌水(市販の純水またはミリQ水をオートクレーブ滅菌したもの)
- エタノール(MFX-2000/2100を用いた自動抽出の場合は99.5%以上の特級品、マニュアル抽出の場合は70%エタノール)

(2) 器具・機材

- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- ホモジナイザー(マイクロチューブ用, 組織処理用)
- 卓上遠心機(3,000~10,000r.p.m.くらいの回転が出来るもの)

MFX-2000/2100をご使用になる場合

- 抽出専用チューブ(Code No.:MFX-301)
- 専用フィルター付きチップ(Code No.:MFX-402A)
- 試薬セット用チューブ(50ml用, 15ml用, 2ml用)*[1]

マニュアル法でご使用になる場合

- 1.5mlマイクロチューブ
- 1.5mlマイクロチューブ用磁気スタンド(市販のもの)
- チューブミキサー(トミー精工社製MT-360など)

---

*[1]試薬セット用チューブには、以下の製品をお使いください。50ml容量チューブ: FALCON® 352070、15ml容量チューブ:FALCON®352096(いずれもBECTON DICKINSON社製)、2ml容量チューブ:アシストチューブNo.72.694(アシスト社製)

2. サンプル前処理方法

本キットは、全血や培養細胞などの生体サンプルに対応していますが、サンプ ルの種類により準備手順が異なります。また、サンプル量は以下に記載された量を厳守ください。指定された量を超えてセットされた場合には、抽出効率が低下します。また、機器動作に支障をきたす場合があります。

(1) 全血

均一に混合した血液100μlをサンプル用チューブ*1に分注します。

・ 採血直後の新鮮血のほかに、EDTAやヘパリンで抗凝固処理したものや凍結保存後に解凍したものが使用できます*2。
・ 血液量が100μlに満たない場合は、溶解・吸着液を添加して、100μlに調整してください。

(2) 培養細胞

PBS（Phosphate-Buffered Saline）で回収した培養細胞1×10^5～1×10^6cell相当をアシストチューブ（No.72.692）または1.5mlマイクロチューブに分注し、遠心分離（6,000r.p.m., 5分間）後、上清を除去します。

・ 細胞の密度が1×10^5～1×10^6cell/100μlの場合には，そのうち100μlをサンプル用チューブに分注して、チューブラックにセットしていただいても結構です。

(3) 組織，マウステール

以下に記載したいずれかの方法により、サンプルの溶解処理を行ってください。肝臓組織等の多くの組織サンプルでは、いずれの前処理方法を行った場合でも、ほぼ同等の抽出効率及び純度でGenomic DNAが得られます*3。

①溶解・吸着液によりサンプルを溶解する方法

組織片（10mg以下）またはマウステール（2～5mm程度）
| ← 850μl 溶解・吸着液
| ホモジナイズ（マイクロチューブ用ホモジナイザーを使用して十分に行う）
| 遠心分離（10,000rpm, 5分）
上清（約850μl）

---

*1 サンプル用チューブとしては，MFX-2000/2100専用チューブ（Code No.：MFX-301）のほかに、アシストチューブ（No.72.692）や1.5mlマイクロチューブでもご使用いただけます。
*2 特に、長期保存されていた血液の場合には、必ず凝固していないことを確認してください。固まりがあるとチップづまりの原因になる場合があります。
*3 組織の種類や状態により、②の前処理を行ったほうが抽出効率がよいことがあります。

・ 全量の上清をサンプル用チューブへ分注します。
・ 分注量が850μlに満たない場合は、溶解・吸着液を添加して、850μlに調整してください。

②Proteinase K消化によりサンプルを溶解する方法

組織片（10mg以下）またはマウステール（2～5mm程度）
｜← 90μl Proteinase K buffer(100mM NaCl,10mM Tris-HCl(pH8.0),25mM EDTA)
｜← 5μl 10mg/ml Proteinase K (30U/mg)
｜← 5μl 10% SDS
｜55℃,6～18時間加温（途中、2、3回混合し、消化を十分に行う）
｜遠心分離（10,000rpm, 5分）
上清（約100μl）

・ 全量の上清をサンプル用チューブへ分注します。
・ 分注量が100μlに満たない場合は、溶解・吸着液を添加して、100μlに調整してください。

3. 抽出フロー

MagExtractor™-Genome-を用いた抽出フローを以下に示します。

サンプル
｜← 溶解・吸着液 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ［サンプルの溶解］
｜← 磁性ビーズ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ［Genomic DNAの吸着］
｜B/F分離
｜← 洗浄液 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ［非特異的吸着物の除去］
｜B/F分離
｜← 70%エタノール・・・・・・・・・・・・・・・・・ ［タンパク質変性剤の除去］
｜B/F分離
｜← 溶出液（滅菌水）・・・・・・・・・・・・・・・・ ［DNAの磁性ビーズからの溶離］
｜B/F分離
上清回収（100μl）

4. MFX-2000/2100を用いたGenomic DNAの抽出

ご使用になる前に、MFX-2000/2100の取扱い説明書を必ずお読みください。

(1)プロトコールの選択

MFX-2000/2100にはGenomic DNA抽出用プロトコールとして以下の3つが用意されています。必要に応じていずれかを選択し*[1]、液晶画面を見ながらプロトコール番号を入力してください。

プロトコール名	入力番号	液晶の表示内容	サンプル(量)
血液用	11	Genome:Blood	血液、Proteinase K消化物などの液体(100μl)
培養細胞用	12	Genome:Cell	培養細胞などの細胞ペレット
組織用	13	Genome:Tissue	組織などの溶解物(850μl)

- 1回の運転では、1つのプロトコールのみ選択可能です。
- それぞれのサンプルの前処理方法は4〜5ページを参照ください。
- PBSで回収した培養細胞の細胞密度が1×10^5〜1×10^6cell/100μlの場合には、そのうち100μlを用いて血液用プロトコール(入力番号:11)をご使用ください。
- 組織やマウステールの前処理を①の方法(溶解・吸着液での溶解)で行った場合には、組織用プロトコール(入力番号:13)を選択し、②(Proteinase Kでの溶解)の場合には血液用プロトコール(入力番号:11)を選択してください。
- 抽出に必要な時間は、1サンプルあたり約11分間です。サンプル数により、抽出時間は異なります。

(2) 加温ブロック、回収ブロックの温度設定

冷却ブロックを以下の温度に設定します。

	加温ブロック	冷却ブロック
設定温度	OFF	10℃

- 加温ブロックは使用いたしませんので電源をOFFにしてください。
- 簡易保冷ブロックの場合、ブロックを冷蔵庫もしくは低温室であらかじめ冷やしておきます。簡易保冷ブロックは、回収液の一時的な保冷が可能です。

---

*[1] 3種類のGenomic DNA抽出用プロトコールは, それぞれ使用するサンプル量(液 量)や前処理方法に応じて「サンプルの溶解」工程のパラメータ条件が至適化されています。したがって、同じサンプルから抽出される場合でも、その液量や前 処理方法に適したプロトコールを選択してください。

(3) 専用フィルター付きチップのセット

専用フィルター付きチップをチップラックにセットします。セット本数は次表を参考に行ってください。

- チップは専用のフィルター付きチップ(Code No.: MFX-402A)をご使用ください。
- チップは、電子線照射滅菌されております。必要な本数の専用チップをチップラックに手袋を着用してセットします。
- 下表に記載された本数より多くセットしていただいても問題ありません。
- チップのセット位置はMFX-2000/2100の取り扱い説明書をお読みください。

		必要チップ本数					必要チップ本数		
プロトコール番号		11	12	13	プロトコール番号		11	12	13
サンプル数	1	7	7	6	サンプル数	13	40	40	39
	2	9	9	8		14	42	42	41
	3	11	11	10		15	44	44	43
	4	13	13	12		16	46	46	45
	5	18	18	17		17	51	51	50
	6	20	20	19		18	53	53	52
	7	22	22	21		19	55	55	54
	8	24	24	23		20	57	57	56
	9	29	29	28		21	62	62	61
	10	31	31	30		22	64	64	63
	11	33	33	32		23	66	66	65
	12	35	35	34		24	68	68	67

(4)専用チューブのセット

専用チューブ(Code No.:MFX-301)を抽出ラックのA～Fと回収ブロックにサンプル数分セットしてください。

- 抽出ラックには専用チューブ以外は使用しないでください。トラブルの原因となることがあります。
- 回収ブロックにはスクリューキャップ式の1.5mlチューブ*[1]をセットすることもできます。
- 詳しいセット方法はMFX-2000/2100の取扱い説明書をお読みください。

---

*[1] アシストチューブ(No.72.692)など

(5) 試薬のセット

試薬はそれぞれ指定のチューブに移し、試薬ラックの所定の位置にセットします。

・ サンプル数に応じて必要な試薬量が異なります。次ページの表に従って試薬をセットしてください。
・ 磁性ビーズは、分注前によく撹拌し、均一に懸濁していることを確認してから2mlチューブに分注してください。また、磁性ビーズのセット後は、速やかに(10分以内に)装置を作動させてください。収量のバラツキや動作上の障害が生じる原因となります。
・ 磁性ビーズの分注は、ピペッターを用いて行ってください。他の試薬については、試薬チューブの目盛りを目安に分注していただいても結構です。
・ 抽出後に残った試薬は再びお使い頂けますが、長時間放置した場合には、蒸発などにより液組成が変化している可能性があります。ご注意ください。
・ 滅菌水とエタノール(99.5%以上の特級品)は本キットに含まれていませんのでご用意ください。
・ プロトコール13を選択する場合には、溶解・吸着液のセットは不要です。

試薬ラックセット位置	試薬名	チューブ容量	プロトコール		
			11	12	13
1	滅菌水	50ml	要	要	要
2	洗浄液	50ml	要	要	要
4	溶解・吸着液	50ml	要	要	不要
5	エタノール	50ml	要	要	要
7	磁性ビーズ	2ml	要	要	要
9	滅菌水	15ml	要	要	要

【各試薬の分注量】

試薬名	滅菌水	洗浄液	溶解・吸着液	エタノール	磁性ビーズ	滅菌水
チューブ容量	50ml	50ml	50ml	50ml	2ml	15ml
セット位置	1	2	4	5	7	9

各試薬チューブに分注する試薬量(ml)

サンプル数	滅菌水	洗浄液	溶解・吸着液	エタノール	磁性ビーズ	滅菌水
1	5 (20)	5 (20)	5 (20)	5 (20)	0.5 (1.5)	2 (5)
2						
3		10 (20)		10 (20)		
4						
5		15 (20)	10 (20)		0.8 (1.5)	
6	10 (20)			15 (20)		3 (5)
7						
8		20 (20)				
9						
10				20 (20)		
11		25 (35)	15 (20)			
12						
13					1 (1.5)	
14		30 (35)		25 (35)		
15						
16	15 (20)	35 (35)				4 (5)
17			20 (20)			
18				30 (35)	1.3 (1.5)	
19		40 (45)				
20						
21						
22		45 (45)		35 (45)		
23			25 (35)		1.5 (1.5)	
24						

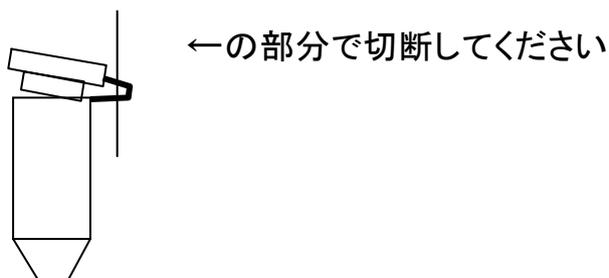
・ サンプル数に応じた各試薬の分注量の目安を記載しています。余剰分を含んでいますので、この数値に従って試薬を試薬チューブへ分注してください。

・ カッコ内の数値は、試薬チューブへ分注する際の最大許容容量の目安を示しています。この数値を超えた量を分注すると、ノズルの汚染や液ダレ等の問題が生じることがあります。

(6)サンプルの前処理及びセット

サンプルは、4～5ページのサンプルの前処理方法に従って調製し、抽出ラックにセットします。

・ スクリューキャップ式の1.5mlサンプルチューブを使用される場合は、キャップを外した状態で、サンプルセット位置にセットします。
・ 通常の1.5mlチューブを使われる場合は、キャップの部分をはさみ等で切断し、セットしてください。

←の部分で切断してください

・1～24までの番号が手前にナンバリングされているホールに、順にセットしてください。

(7)抽出開始

以下の要領で抽出をスタートさせます。

・ サンプル、試薬チューブ、専用チューブ(抽出ラックと回収ブロック)、専用チップが説明書通りにセットされていることを確認します。
・ 各ラックのセット位置と、ステージが完全に奥まで収納されていることを確認し、前面扉を閉めてください。
・ 液晶画面に、適切なプロトコール番号とサンプル数が入力されていることを確認します。
・ "スタートキーヲオシテクダサイ"と画面に表示されていることを確認して"START"キーを押してください。
・ 抽出操作が始まると液晶画面に"ドウサチュウ"と表示されます。

(8)サンプルの回収

抽出操作が終了したら，前面の扉を開けてサンプルを取り出します。

- 抽出が完了すると、抽出されたDNAは回収ブロック上のチューブに回収されます。また、液晶画面には、再び“スタートキーヲオシテクダサイ”と表示されます。
- 装置が完全に停止していることを確認した後、回収ブロックよりチューブを取り出し、使用するまで氷上または低温（4〜10℃）にて保存ください。
- 磁性ビーズからのDNAの溶出は、100μlの溶出液(滅菌水)を使用して行いますので、回収液量はおよそ100μlとなります。

5. マニュアル法によるGenomic DNAの抽出

本キットはマニュアル法でのDNA抽出にもご利用いただけます＊[1]。サンプルの種類に応じて、以下の手順に従って抽出を行ってください。

- サンプルの種類により準備手順が異なります。詳しくは、「サンプル前処理方法」の項（4〜5ページ）をご覧ください。
- 磁性ビーズの分離には、市販の1.5mlマイクロチューブ用磁気スタンドを使用されることをおすすめしますが、卓上遠心機で3,000r.p.m.，30秒間程度の遠心分離によって分離することも可能です。
- 本キットのほかに、70%エタノールと滅菌水が必要です。特級グレードのエタノールと滅菌水を7:3の割合で混合することによって、70%エタノールをあらかじめ調製してください（1サンプルあたり1.8ml必要です）。
- 抽出操作は、全て室温で行ってください。

(1)全血

① 1.5mlマイクロチューブに血液100μlを分注します。

② 溶解・吸着液750μlと磁性ビーズ40μlを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、激しく混合します。

・磁性ビーズは、必ず、あらかじめよく混合してからお使いください。

・サンプルと磁性ビーズが十分に混合されるように、攪拌スピードを調節してください。

＊[1] 使用する全ての試薬量とサンプル量を比例させ、増減させることにより、抽出スケールを変えることも可能です。

③ チューブを磁気スタンドにセットして、30秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集めた後、上清を除去します。

・チューブのキャップ内側に磁性ビーズが付着した場合には、チューブを磁気スタンドにセットした状態で、3回程度、転倒混和させることによって、磁性ビーズを完全に集めてください。

・チューブを磁気スタンドにセットした状態で、マイクロピペットを使用して上清を除去してください。

・磁性ビーズを吸い取らないように注意しながら、上清を可能な限り除去してください。

④ チューブに洗浄液900μlを加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、5秒間程度、激しく混合します。

・磁性ビーズが、均一に分散するまで行ってください。

⑤ チューブを磁気スタンドにセットして、30秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集めた後、上清を除去します。

・③と同様に行います。

⑥ ④～⑤のステップをもう一度行います。

⑦ 70%エタノール900μlを加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、5秒間程度激しく混合します。

・磁性ビーズが、均一に分散するまで行ってください。

⑧ チューブを磁気スタンドにセットして、30秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集めた後、上清を除去します。

・③と同様に行います。

⑨ ⑦～⑧のステップをもう一度行います。

⑩ 滅菌水100μlを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、混合することによってGenomic DNAを溶出させます。

・チューブの壁に付けないようにして、チューブの底に滅菌水を入れてください。

・②と同様に、サンプルと磁性ビーズが十分に混合されるように攪拌スピードを調節しますが、液がチューブのキャップ内側に付着しないように調節してください。

⑪ チューブを磁気スタンドにセットして、30秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集めた後、Genomic DNAが含まれる上清を新しい1.5mlマイクロチューブに回収します。

【操作フロー】

100μl血液
| ← 750μl 溶解・吸着液
| ← 40μl 磁性ビーズ(転倒攪拌して均一混和したもの)
| 10分攪拌
| B/F分離
| ← 900μl 洗浄液 ┐
| 5秒攪拌 │ 2回行う
| B/F分離 ┘
| ← 900μl 70%エタノール ┐
| 5秒攪拌 │ 2回行う
| B/F分離 ┘
| ← 100μl 滅菌水
| 10分攪拌
B/F分離
上清

(2)培養細胞

① 1.5mlマイクロチューブに、PBS（Phosphate-Buffered Saline）で回収した培養細胞 1×10^5 ～ 1×10^6 cell相当を1.5mlマイクロチューブに分注した後、遠心分離（6,000r.p.m., 5分間）してから上清を除去します。

② 溶解・吸着液850μlと磁性ビーズ40μlを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、激しく混合します。
・磁性ビーズは、必ず、あらかじめよく混合してからお使いください。
・サンプルと磁性ビーズが十分に混合されるように、攪拌スピードを調節してください。

③ (1)全血の手順③～⑪（12～13ページ）を行い、最終的に、Genomic DNAが含まれる上清を新しい1.5mlマイクロチューブに回収します。

【操作フロー】

PBSで回収した培養細胞 1×10^5～1×10^6 cell
| 遠心分離（6,000r.p.m., 5分）
| 上清除去（細胞を集める）
| ← 850μl 溶解・吸着液
| ← 40μl 磁性ビーズ（転倒攪拌して均一混和したもの）
| 10分攪拌
| B/F分離
| ← 900μl 洗浄液 ┐
| 5秒攪拌 │ 2回行う
| B/F分離 ┘
| ← 900μl 70%エタノール ┐
| 5秒攪拌 │ 2回行う
| B/F分離 ┘
| ← 100μl 滅菌水
| 10分攪拌
| B/F分離
上清

(3)組織，マウステール（溶解・吸着液によりサンプルを溶解する方法）

① 1.5mlマイクロチューブに組織片（10mg 以下）またはマウステール（2～5mm程度）を入れ、これに溶解・吸着液850μlを加えた後、マイクロチューブ用ホモジナイザーを使用して十分にホモジナイズします。

② 遠心分離（10,000r.p.m., 5分間）後、上清を新しい1.5mlマイクロチューブに移します。

③ これに磁性ビーズ40μlを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、激しく混合します。

・磁性ビーズは、必ず、あらかじめよく混合してからお使いください。

・サンプルと磁性ビーズが十分に混合されるように、攪拌スピードを調節してください。

④ (1)全血の手順③～⑪（p12～13）を行い、最終的に、Genomic DNAが含まれる上清を新しい1.5mlマイクロチューブに回収します。

【操作フロー】

組織片（10mg以下）またはマウステール（2～5mm程度）
｜← 850μl 溶解・吸着液
｜十分にホモジナイズ
｜遠心分離（10,000r.p.m., 5分）
｜上清を1.5mlチューブに分注
｜← 40μl 磁性ビーズ（転倒攪拌して均一混和したもの）
｜10分攪拌
｜B/F分離
｜← 900μl 洗浄液 ┐
｜5秒攪拌 ├ 2回行う
｜B/F分離 ┘
｜← 900μl 70%エタノール ┐
｜5秒攪拌 ├ 2回行う
｜B/F分離 ┘
｜← 100μl 滅菌水
｜10分攪拌
｜B/F分離
上清

(4)組織，マウステール（Proteinase Kによりサンプルを溶解する方法）

① 1.5mlマイクロチューブに組織片（10mg以下）またはマウステール（2～5mm程度）を入れ、これに90μl Proteinase K buffer(100mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH8.0), 25mM EDTA)、5μl 10mg/ml Proteinase K (30U/mg)、5μl 10% SDSを順に加えてよく混合した後、55℃で6～18時間加温する。
・途中、2，3回混合し、消化を十分に行ってください。

② 遠心分離（10,000r.p.m.,5分間）後、上清を新しい1.5mlマイクロチューブに移します。

③ これに溶解・吸着液750μlと磁性ビーズ40μlを加えた後、チューブミキサーを使用して、10分間、激しく混合します。
・磁性ビーズは、必ず、あらかじめよく混合してからお使いください。
・サンプルと磁性ビーズが十分に混合されるように、攪拌スピードを調節してください。

④ (1)全血の手順③～⑪（12～13ページ）を行い、最終的に、Genomic DNAが含まれる上清を新しい1.5mlマイクロチューブに回収します。

【操作フロー】

組織片（10mg以下）またはマウステール（2～5mm程度）
｜← 90μl Proteinase K buffer(100mM NaCl,10mM Tris-HCl(pH8.0),25mM EDTA)
｜← 5μl 10mg/ml Proteinase K (30U/mg)
｜← 5μl 10%SDS
｜55℃，6～18時間加温
｜遠心分離（10,000r.p.m., 5分）
｜上清を1.5mlチューブに分注
｜← 750μl 溶解・吸着液
｜← 40μl 磁性ビーズ（転倒攪拌して均一混和したもの）
｜10分攪拌
｜B/F分離
｜← 900μl 洗浄液 ┐
｜5秒攪拌 │ 2回行う
｜B/F分離 ┘
｜← 900μl 70%エタノール ┐
｜5秒攪拌 │ 2回行う
｜B/F分離 ┘
｜← 100μl 滅菌水
｜10分攪拌
｜B/F分離
上清

6. 抽出後の分析

(1)DNAの定量

回収液中のDNA量は、波長260nmの吸光度を測定することにより定量できます。

- 吸光度を測定する時は、必ず回収液を遠心分離(10,000r.p.m., 1分間)し、その上清を使用してください。
- A_{260nm}/A_{280nm} 比やDNA 濃度の算出の際は、必ずA_{320nm}値をバックグラウンドとして補正してください。

(2)電気泳動

回収液の一部に市販または自家調製の電気泳動用Loading Dyeを混合した後に、アガロースゲルへアプライします。

- アプライ時に混合するLoading Dyeの量を通常使用される量の1.5～2倍程度としてください。泳動用サンプルがウェル内に沈降せず、正常にアプライできないことがあります。

(3)PCR

回収液の一部を鋳型サンプルとしてPCRを行うことにより、回収液中に含まれるDNAをターゲットとしたPCRが可能です。

- 回収液中に微量の磁性ビーズが混入することがありますが、PCRにはそのまま使用していただいても差し支えありません。
- 回収液には10%程度のエタノールが混入します。PCRに使用される場合には、反応を阻害することがありますので、反応液の1/5量(反応液量が50μlの場合には10μl)を超えない範囲でご使用ください。

[5] トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策をご参照ください。

(1)収量が低い、DNAが得られない

原因	対策
サンプル過剰	規定量以上のサンプルを使用されても, 収量は上がらず、むしろ収率は低下します。サンプル量を適正 にしてください。
破砕、溶解が不十分	(組織, マウステールの場合) サンプルの前処理(p4～5)が不十分なことが考えられます。①の前処理方法(溶解・吸着液での溶解)の場合には、時間をかけて(5分間以上)、組織の固まりが見えなくなるまで十分にホモジナイズ を行ってください。 また、ホルマリン固定組織等の一部のサンプルでは①の方法では溶解できないことがあります。②の前処理(Proteinase K での溶解)を行ってみてください。
	(グラム陽性菌などの場合)サンプルがグラム陽性菌であるなど、本キット添付の溶解・吸着液で溶解できないサンプルの場合には、特別な溶解処理が必要です。例えば、酵母の場合には、あらかじめZymolyaseなどの溶解酵素により、細胞壁を溶解しておく必要があります。
試薬量の不足	MFX-2000による自動抽出の場合には、試薬が不足 していなかったか、全ての試薬の残量を確認してください。ほとんど残っていない(200μl以下の)場合には、不足していたことが考えられます。

・ なお、サンプルの種類や保存状態により、収量(収率)は変動します。

(2)PCRがうまくいかない

原因	対策
回収液中に混在するエタノールによる阻害	反応液の1/5を超える量を使用すると反応が阻害されることがありますので、その場合には使用する液量を減らしてください。 また、回収液を75℃で5分間程度、加温することにより改善されることがあります。

ターゲットサイズが長すぎる	抽出されるDNA の平均鎖長は40kb程度（全血DNAの場合）ですので、一般的なPCRの鋳型としては特に問題ありませんが、ターゲットサイズが5kb以上の場合には、PCR酵素の性能上、増幅しにくい場合があります。その場合には、KOD Dash DNA Polymerase （Code No. : LDP-101）などのLong Distance PCR用酵素の使用をおすすめします。

・ その他のPCRに関するトラブルシューティングは、弊社各種PCR用酵素の実施例集やPCRに関する解説書等を参考にしてください。

(3)洗浄時にビーズが完全に分散しない、チップにビーズがつまる
（MFX-2000/2100による 自動抽出の場合）

原因	対策
サンプル過剰	サンプル量が過剰な場合には、ビーズが凝集する傾向があります。また、規定量以上のサンプルを使用されても、収量は上がらず、むしろ収率は低下します。サンプル量を減らしてみてください。
試薬量の不足	試薬が不足していなかったか、全ての試薬の残量を確認してください。ほとんど残っていない（200μl以下）場合には、不足していたことが考えられます。洗浄液が不足していると攪拌が不十分となり、ビーズが分散しないことがあります。

(4)ビーズがうまく分注されない（MFX-2000/2100による自動抽出の場合）

原因	対策
磁性ビーズの沈降による固化	ボルテックスを行って均一になるまで懸濁させた後は、再び抽出に使用できます。なお、抽出をスタートさせる前には、ボルテックスを行って均一になるまで懸濁させるか、スタート直前（10分以内）に磁性ビーズを2mlチューブへ移すようにしてください。
蒸発による磁性ビーズ懸濁液成分の濃縮	今後のトラブルを防ぐために、2mlチューブに残ったビーズは廃棄してください。また、保存の際や短時間でも放置される場合には、ボトルやチューブのフタを堅く締めるようにしてください。

・ その他の機器動作に関するトラブルシューティングは、MFX-2000/2100の取扱い説明書にも記載していますので、あわせてご覧ください。

[6] 参考文献

1) Vogelstein, B., and Gillespie , D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 615-619

2) Boom, R., 801 , C.J.A., 8alimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., and van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin Microbiol.* 28: 495-503

[7] 関 連 商 品

品　名	内　容	Code No.
Mag*ical Trapper* ＜磁性ビーズ分離用スタンド＞	1台	MGS-101

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号　住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/bio